

**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**EFEITO DA SEQUESTRAÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS NA EFICÁCIA
FUNCIONAL DE CICLOS METABÓLICOS DE TRANSFERÊNCIA DE
GRUPOS**

Flávio Fortes Ramos Sousa

**Coimbra
2009**

Índice

Agradecimentos	4
Abreviaturas	5
Anotações	6
Resumo	8
Summary	11
1 Introdução	14
1.1 Ciclo Metabólico de Transferência de Grupo	14
1.2 Objectivos	23
2 Metodologia	24
2.1 Teoria de Sistemas Bioquímicos	24
2.1.1 Ganho logaritimico	25

2.1.2	Sensibilidade	27
2.1.3	Estabilidade de sistemas dinâmicos	27
2.1.4	Lei cinética: Sistemas S	29
2.2	Crerios de eficácia funcional de um CMTG	33
3	Resultados	36
3.1	Princípios de <i>Design</i> dum CMTG	36
3.2	Comparação do ciclo com sequestração do intermediário car- regado com o ciclo referência	40
3.2.1	Comparação entre os dois ciclos para uma concentração do intermediário total constante	42
3.2.2	Comparação controlada a concentrações equivalentes de intermediário descarregado	57
3.3	Comparação entre o ciclo com sequestração do intermediário descarregado e o ciclo referência	62
3.3.1	Comparação a concentração do intermediário total cons- tante	63
3.3.2	Comparação controlada a concentrações equivalentes de intermediário carregado	69
4	Discussão	72

5	Apêndices	80
5.1	Ganho logaritimico de X_2 com respeito a X_6	80
5.2	Ordem cinética generalizada	82

Agradecimentos

Queria agradecer ao Doutor Armindo Salvador, o orientador científico deste trabalho pela introdução no campo de *Systems Biology* e pelos ensinamentos.

À Professora Doutora Maria João Moreno, orientadora do Departamento de Química, expresso a minha gratidão pela oportunidade de realizar este trabalho.

Também agradeço aos elementos dos Grupos *Molecular Systems Biology* e Química Biológica pelo excelente ambiente de trabalho.

Abreviaturas

ADP: Adenosina difosfato

ATP: Adenosina trifosfato

BST: Biochemical Systems Theory

CMTG: Ciclo Metabólico de Transferência de Grupo

NADH: Dinucleótido de nicotinamina-adenina

NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamina-adenina

Anotações

ciclo r : ciclo referência

ciclo s_2 : ciclo com sequestração de X_2

ciclo s_1 : ciclo com sequestração de X_1

E_C : enzima de carga, que transfere o grupo do dador para o intermediário descarregado

E_D : enzima de descarga, que transfere o grupo do intermediário carregado para o aceitante

g_{ij} : ordem cinética generalizada da produção de X_i em relação a X_j

h_{ij} : ordem cinética generalizada do consumo de X_i em relação a X_j

L_{ij} : ganho logaritimico de X_i com respeito a variações em X_j

K_1 : constante de equilíbrio aparente da sequestração de X_1

K_2 : constante de equilíbrio aparente da sequestração de X_2

K_M : constante de Michaelis-Menten

$S(X_i, p)$: sensibilidade de X_i ao parâmetro p

V_{max} : velocidade máxima de uma enzima com cinética do tipo Michaelis-Menten

X_i : espécie química X_i ou concentração da espécie química X_i

X_1 : intermediário recirculado na forma descarregada

X_2 : intermediário recirculado na forma carregada

X_3 : forma sequestrada de X_1

X_4 : forma sequestrada de X_2

X_5 : dador de grupo num CMTG

X_6 : aceitante

$X_7 := X_1 + X_2$:

$X_8 := X_1 + X_2 + X_4$:

$X_9 := X_1 + X_2 + X_3$:

Y_i : logaritmo de X_i

α : constante cinética de reacção de descarga de grupo

β : constante cinética de reacção de carga de grupo

α_i : constante cinética de consumo de X_i

β_i : constante cinética de produção de X_i

λ : expoente de Lyapunov

Resumo

Um Ciclo Metabólico de Transferência de Grupo, CMTG, é um conjunto de reacções químicas acopladas, catalisadas por enzimas, que transfere um grupo químico de um dador para um aceitante, via um intermediário recirculado.

No caso minimalista - ciclo referência - o ciclo tem duas reacções. Uma reacção, catalisada por uma enzima de carga, onde o dador transfere o grupo químico para o intermediário, que passa de intermediário descarregado a intermediário carregado. Outra reacção catalisada por uma enzima de descarga, onde o intermediário carregado transfere o grupo para o aceitante.

Os CMTG's exibem diversidade a nível do *design*, sendo muito comum que o intermediário tanto na forma carregada como na descarregada seja sequestrado.

Na primeira parte do trabalho, investiga-se os princípios de *design* dum CMTG e na segunda parte investiga-se as implicações funcionais da sequestração do intermediário carregado e do descarregado.

Quanto aos princípios de *design* dum CMTG, concluiu-se, utilizando novos métodos, que para um CMTG funcionar eficazmente, o intermediário deve estar predominantemente na forma carregada, a enzima de carga deve estar saturada com o dador enquanto que a enzima de descarga deve estar saturada com o intermediário carregado e insaturada com o aceitante.

A comparação entre os diferentes *design*'s, mostrou que a sequestração do intermediário carregado tem as seguintes vantagens:

- aumenta a tamponização do intermediário carregado com respeito à variações nas variáveis externas
- diminui a sensibilidade da concentração do intermediário carregado às actividades enzimáticas
- aumenta o acoplamento entre a demanda e o fluxo de fornecimento de grupos para o aceitante.

No entanto, a sequestração desse intermediário tem a desvantagem de aumentar o tempo de resposta do ciclo à perturbações.

A sequestração do intermediário descarregado, por seu lado, piora as tamponizações, as sensibilidades e o acoplamento referidos acima. Quanto ao aspecto temporal não se obteve um resultado absoluto do efeito dessa sequestração, mas antes, mostrou-se que o resultado depende do ambiente, pois para certos ambientes melhora o tempo de resposta em relação ao ciclo referência e para outros piora.

Concluiu-se que há uma relação de compromisso entre os diferentes aspectos da eficácia funcional. A sequestração do intermediário carregado melhora os aspectos relacionados com propriedades estacionárias, isto é , tamponizações, sensibilidades e outros, enquanto que piora os aspectos temporais. Já a sequestração do intermediário descarregado piora os aspectos relacionados com variações nas propriedades estacionárias.

Summary

A moiety-transfer cycle, MTC, is a set of coupled enzyme-catalyzed chemical reactions that transfer a chemical moiety from a donor to an acceptor via a circulated intermediate.

In the minimalist case - reference cycle - the cycle is composed by two reactions. One reaction, catalyzed by a charging enzyme, transfers the moiety from the donor to the moiety-uncharged intermediate. The second reaction, catalyzed by an uncharging enzyme, transfers the group from the charged intermediate to the acceptor.

MTCs exhibit diversity in their design, being common that the intermediate in its charged or uncharged form is sequestered by proteins.

In the first part of this work we investigate the design principles of a MTC and in the second part we analyse the functional implications of the seques-

tration of the charged and uncharged intermediate.

We showed that in order for MTC to effectively mediate supply and demand of moiety they must be designed according to the following principles: a) the intermediate must be predominantly in its charged form, b) the charging enzyme must be unsaturated with the uncharged intermediate and saturated with the donor, c) the uncharging enzyme must be saturated with the charged intermediate and unsaturated with the acceptor

The comparison of cycles with and without sequestration showed that sequestration of the charged intermediate has the following advantages:

- increases the buffering of the charged intermediate concentration against variations in the external variables
- decreases the sensitivities of the charged intermediate concentration to the activities of the enzymes
- increases the coupling between the demand and the flux of group transfer to the acceptor

However, it has the disadvantage of increasing the response time of the cycle to perturbations.

The sequestration of the uncharged intermediate was showed to have the disadvantage of worsening all the above bufferings, sensitivities and coupling. The qualitative effect on the response times depends on the environment.

We concluded that there is a trade-off situation between different aspects of functional efficacy. The sequestration of the charged intermediate improves the aspects related to changes in the steady state properties, such as bufferings, sensitivities and others, but worsen the response time.

1

Introdução

1.1 Ciclo Metabólico de Transferência de Grupo

A selecção natural actua sobre qualquer população de indivíduos que se reproduzem, favorecendo os mais aptos, adaptando deste modo os indivíduos ao ambiente. A adaptação dos indivíduos dá-se à vários níveis, a nível dos órgãos, dos tecidos, da morfologia celular e também a nível bioquímico, nomeadamente metabólico.

O metabolismo celular é o conjunto de reacções químicas numa célula. Muito comumente, o metabolismo é dividido em anabolismo - vias metabólicas que fornecem energia em forma de grupos químicos reactivos que activam outras moléculas - e catabolismo - vias metabólicas que usam esses grupos químicos

para construir componentes celulares como DNA e proteínas.

A adaptação metabólica dá-se a dois níveis. Ao nível quantitativo, ou seja ao nível dos parâmetros cinéticos das reacções que são optimizados, e também ao nível da rede de interacções, ou seja, do tipo de reacções em que cada molécula participa.

À propriedade do sistema, quantitativa ou qualitativa, que confere a adaptação chama-se princípio de design. A adaptação dá-se a estes dois níveis porque ambos podem exibir diversidade, que reflecte diversidade a nível do genoma do organismo.

A nível paramétrico, põe-se a questão de saber que vantagens funcionais os valores dos parâmetros exibidos da célula apresentam. Já ao nível da rede de interacções põe-se a questão de saber o impacto que as diferenças estruturais têm na funcionalidade do circuito metabólico.

Os primeiros estudos de teóricos sobre comparação funcional de diferentes designs de circuitos metabólicos datam do início da década de 1970 [2].

Savageau(1971) introduziu então o conceito de robustez - definida como baixa sensibilidade de variáveis de estado, funcionalmente relevantes, a variações nos parâmetros que definem a estrutura do sistema - como critério importante na avaliação da *performance* de sistemas bioquímicos. Esse conceito

viria a tornar-se uma pedra angular da biologia de sistemas.

A investigação dos princípios de *design* tem grande importância para a biomedicina, pois um caso patológico pode estar associado a ausência de um certo princípio de design.

O grupo de Biologia Molecular Orientada para Sistemas (MSBG)¹ tem vindo a desenvolver um programa de investigação direccionado para a caracterização dos princípios de design dos circuitos elementares mais prevalentes em redes metabólicas.

Funcionando como ponte entre o catabolismo e o anabolismo e também no fornecimento de equivalentes redutores a processos de defesa antioxidante, os ciclos metabólicos de transferência de grupo, CMTG, são circuitos metabólicos que transferem grupos moleculares dum dador para um aceitante. A transferência de grupos moleculares dá-se via intermediários que são recirculados [1]. O caso minimalista dum CMTG está representado na figura 1.1. Um dador, X_5 transfere um grupo para o intermediário descarregado, X_1 , que passa a intermediário carregado, X_2 , numa reacção catalisada por uma enzima de carga, E_C . X_2 transfere o grupo para o aceitante X_6 , numa reacção catalisada por uma enzima de descarga, E_d .

¹*Molecular Systems Biology* Group

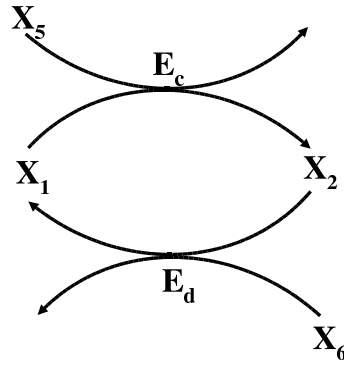


Figura 1.1: Ciclo referência: X_5 é o dador, X_1 intermediário descarregado, X_2 intermediário carregado, X_6 o aceitante, E_c a enzima de carga, E_d a enzima de descarga

Nesse design mais simples, que é representativo do que acontece, por exemplo, na maioria dos ciclos redox celulares, o aumento da concentração de aceitante sinaliza ao circuito um aumento de demanda.

Intermediários muito comuns são o pares ADP/ATP em que o grupo transferido é o grupo fosfato, e os pares $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ e NAD^+/NADH em que o grupo transferido é um par de electrões.

Um CMTG tem uma função análoga de uma fonte de alimentação eléctrica num circuito electrónico, dispositivo que ajusta o fornecimento de energia à demanda e que mantém a constância da voltagem.

O CMTG deve fornecer grupos à velocidade exigida (analogamente à intensi-

dade de corrente) e manter a concentração do intermediário carregado quase constante (analogamente à voltagem).

Na figura 1.2 apresenta-se um exemplo celular dum CMTG, que ocorre no cloroplasto das plantas. A ferredoxina reduz o NADP^+ , que depois transfere os electrões para o 1,3-bifosfoglicerato, originando o gliceraldeído 3-fosfato.

Devido ao papel que desempenham os CMTG's são cruciais para os organismos. De facto, das reacções catalisadas por enzimas na *Escherichia coli*, 75% participam em CMTG's enquanto que na *Saccharomyces cerevisiae* são 67% [3].

Num estudo recente, Coelho *et al.*[3] investigou os princípios de design de um CMTG representado na figura 1.1. Com base na analogia que um CMTG tem com a fonte de alimentação num circuito electrónico, estabeleceram-se critérios de *performance*, discutidos adiante, na secção 2.2. Nesse trabalho, o espaço dos parâmetros foi dividido em regimes com propriedades funcionais distintas, baseado numa aproximação das cinéticas enzimáticas por blocos [4], e procedeu-se à identificação do regime com melhor *performance*. Para compreender a aproximação em blocos apresenta-se na figura 1.3, a aproximação duma enzima com cinética de Michaelis-Menten em dois blocos.

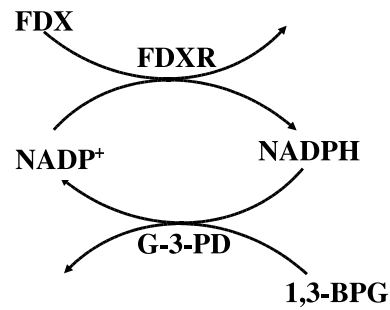


Figura 1.2: Ciclo de transferência de par de electrões nos cloroplastos das plantas.

FDX: ferrodoxina, G-3-P: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, FDX: ferrodoxina reductase, 1,3 BPG: 1,3 bifosfoglicerato

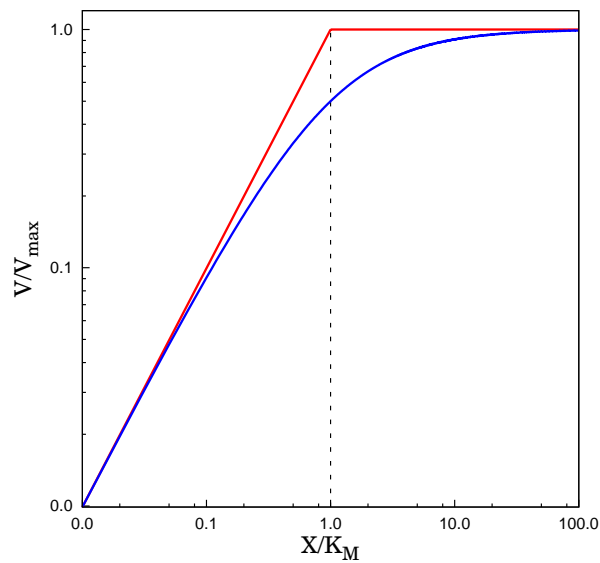


Figura 1.3: Separação em blocos da cinética enzimática com um único substrato.

Linha azul: Michaelis-Menten. A linha tracejada ($X = K_M$) separa dois blocos, à esquerda a enzima está insaturada com o substrato e à direita saturada.

Cada bloco representa um regime extremo de funcionamento da enzima, sendo que no bloco à esquerda da recta vertical ($X = K_M$) se considera que a enzima está insaturada com o substrato e à direita está saturada.

O estudo mostrou que há um regime global de melhor *performance* que é aquele em que a enzima de descarga se encontra saturada com o intermediário carregado e insaturada com o aceitante e a enzima de carga insaturada com o intermediário descarregado e saturada com o dador. Trabalho mais recente [5] permitiu caracterizar e validar parcialmente princípios de design adicionais.

Princípios de design semelhantes já tinham sido verificados em trabalhos anteriores [6, 7], incidindo sobre ciclos do NADPH e do glutathione em eritrócitos humanos. Esses ciclos, representados na figura 1.4, transferem equivalentes redutores.

Os CMTG's exibem diversidade estrutural. Frequentemente os intermediários tanto na forma carregada como na forma descarregada são sequestrados por proteínas como é o caso do NADPH/NADP⁺ e do NADH/NAD⁺, ou por associação covalente reversível com proteínas como é o caso do GSH.

Na figura 1.5 apresentam-se três variações dum CMTG.

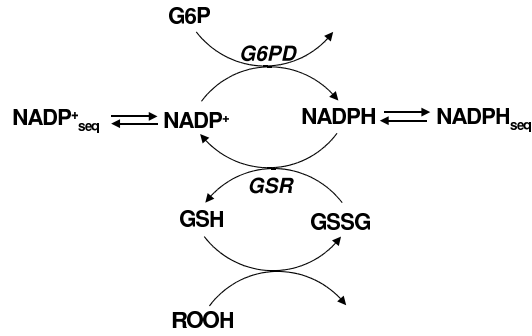


Figura 1.4: CMTG, envolvido na desintoxicação de espécies reactivas de oxigénio

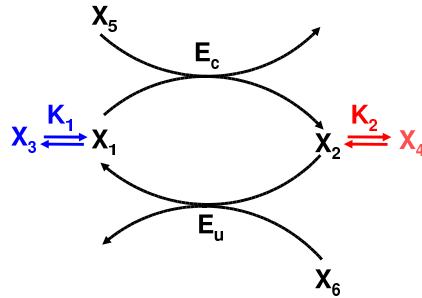


Figura 1.5: Diversidade de CMTG's. Preto: ciclo referência (ciclo r); Preto + Vermelho: ciclo com sequestração do intermediário carregado, X_2 , (ciclo s_2); Preto + Azul: ciclo com sequestração do intermediário descarregado, X_1 , (ciclo s_1)

Mostram-se o ciclo referência, o ciclo com sequestração do intermediário carregado X_2 (ciclo s_2) e o ciclo com sequestração do intermediário descarregado X_1 (ciclo s_1)².

Note-se que numa perspectiva evolutiva, os ciclos s_1 e s_2 podem facilmente “degenerar” no ciclo referência devido a uma única mutação que inactive o centro de ligação da proteína sequestrante. Já a criação de um novo centro de ligação requer normalmente várias mutações e é um fenómeno muito mais improvável. Portanto, num cenário evolutivo em que a sequestração seja selectivamente neutra ela seria perdida no espaço de poucas gerações devido ao efeito da entropia mutacional. Isto sugere que a manutenção da sequestração numa escala de tempo evolutiva seja devida a vantagens funcionais que favoreçam a selecção natural de circuitos com sequestração em detrimento do circuito referência. Por outro lado, a própria catálise das reacções que usam cada um dos intermediários recirculados implica alguma sequestração destes intermediários sob a forma de complexos enzima-substrato e enzima-produto. Por isso, alguma sequestração é inevitável mesmo que esta não traga vantagens selectivas. Mas como as concentrações de enzimas tendem a ser muito inferiores às dos respectivos substratos, não parece plausível que

²A sequestração do intermediário carregado passa a designar-se por sequestração s_2 e a sequestração do intermediário descarregado por sequestração s_1 .

a formação de complexos enzima-substrato explique a sequestração de uma fracção significativa do intermediário sequestrado.

1.2 Objectivos

O objectivo do trabalho é investigar as vantagens e desvantagens funcionais das sequestrações s_2 e s_1 .

Essas vantagens ao existirem devem ser validadas por dados experimentais, ou seja os ciclos com melhor *performance* devem ser os mais predominantes nas células. Eventuais discordâncias entre *performance* e predominância têm de ser racionalizadas, tendo em conta a particularidade química das espécies participantes.

Como preliminar necessário ao esclarecimento dessa questão, numa primeira parte do trabalho investiga-se os princípios de design dum CMTG.

A metodologia baseia-se na Teoria dos Sistemas Bioquímicos, desenvolvida para caracterizar redes bioquímicas e comparar diferentes *designs* de circuitos.

2

Metodologia

2.1 Teoria de Sistemas Bioquímicos

A Teoria de Sistemas Bioquímicos [8, 9, 10, 11] permite caracterizar um circuito metabólico e comparar diferentes *design*'s de circuitos.

Normalmente assume-se que os sistemas metabólicos estão em estado estacionário, as concentrações são constantes, pois a produção balança o consumo. Quando perturbados por uma variação numa variável externa ou num parâmetro do sistema, seguem para outro estado estacionário.¹

¹Nem todas as perturbações conduzem o sistema de um estado estacionário a outro.

Algumas perturbações podem atravessar um ponto de bifurcação a partir do qual o sistema deixa de ter um estado estacionário.

É de importância saber como certas propriedades sistêmicas variam de um estado estacionário a outro, bem como a dinâmica da transição.

Os ganhos logaritmicos e sensibilidades permitem quantificar a variação de variáveis internas em resposta à perturbações de variáveis externas.

Caso o estímulo ou perturbação seja retirado o sistema volta ao estado estacionário anterior, nesse caso interessam os aspectos temporais, nomeadamente o tempo de resposta, o tempo que leva a voltar ao estado estacionário.

2.1.1 Ganho logaritmico

O ganho logaritmico L_{ij} quantifica a variação percentual numa variável interna X_i com a variação percentual numa variável externa X_j , sendo que as outras variáveis externas e parâmetros se mantêm.

$$L_{ij} = \frac{\frac{\Delta X_i}{X_i}}{\frac{\Delta X_j}{X_j}} \quad (2.1)$$

com $\Delta X_j \rightarrow 0$. Ou seja

$$L_{ij} = \frac{\partial Y_i}{\partial Y_j} \quad (2.2)$$

onde $Y_i = \log X_i$.

Caso ocorra uma variação de 1% na variável externa X_j , quando se atinge o

novo estado estacionário, a variação na variável interna X_j será aproximadamente $L_{ij}\%$.

O sinal do L_{ij} permite saber a correlação entre a variável interna e a externa. Um valor positivo de L_{ij} significa que X_i está correlacionado positivamente com X_j , ou seja, X_i aumenta (decrece) quando X_j aumenta (decrece). Um valor negativo significa correlação negativa, já $L_{ij} = 0$ quer dizer que a variável interna não varia com a externa.

Também se tira informação qualitativa do valor absoluto do ganho logaritmico. $|L_{ij}| > 1$ quer dizer uma ampliação da variação original, $|L_{ij}| < 1$ uma atenuação e $L_{ij} = 1$ significa que a variação percentual da variável interna é a mesma que a da variável externa.

Normalmente, a variável interna é uma concentração ou um fluxo ou velocidade de reacção. Adiante denotaremos por L_{25} o ganho logaritmico de X_2 com respeito à variação de X_5 e por L_{v6} é o ganho logaritmico da velocidade v com respeito à variação de X_6 .

2.1.2 Sensibilidade

A sensibilidade $S(X_i, p)$ quantifica a variação percentual numa variável interna i com a variação percentual dum parâmetro p .

$$S(X_i, p) = \frac{\partial Y_i}{\partial \log p} \quad (2.3)$$

A influência total numa variável interna X_i é definida como

$$\sum_p |S(X_i, p)| \quad (2.4)$$

onde p percorre todos os parâmetros do sistema.

2.1.3 Estabilidade de sistemas dinâmicos

Nos sistemas bioquímicos normalmente os estados estacionários são estáveis, querendo dizer que pequenas alterações nas variáveis internas em torno do estado estacionário não alteram o estado estacionário.

Põe-se a questão de saber avaliar a estabilidade de um estado estacionário.

Considere-se um sistema com apenas uma variável dinâmica cuja evolução temporal é determinada pela equação diferencial

$$\frac{dX}{dt} = f(X) \quad (2.5)$$

A estabilidade é determinada pela taxa de variação de X no ponto estacionário X_0 .

$$\lambda = \frac{df(X)}{dX} \Big|_{X_0} \quad (2.6)$$

O sistema é estável se $\lambda < 0$, instável se $\lambda > 0$.

Quando há perturbações macroscópicas nas variáveis externas o valor de $\frac{1}{\lambda}$ quantifica o tempo de relaxação, o tempo que o sistema leva a transitar dum estado estacionário a outro, após uma perturbação. Quanto mais negativo for λ menor é o tempo de relaxação. Esse resultado baseia-se na linearização do sistema, segundo a qual, a taxa de variação de X é directamente proporcional à distância a que se está do estado estacionário a ser atingido,

$$\frac{dX}{dt} = \lambda(X - X_0) \quad (2.7)$$

λ é o inverso do tempo necessário para a variável X atingir 37% do intervalo entre o seu valor imediatamente após a perturbação e o valor de estado estacionário.

Para um sistema com duas variáveis

$$\frac{dX_1}{dt} = f(X_1, X_2) \quad (2.8)$$

$$\frac{dX_2}{dt} = g(X_1, X_2) \quad (2.9)$$

A estabilidade do sistema pode ser determinada a partir dos valores próprios da matriz jacobiana \mathbf{J}

$$\mathbf{J} = \begin{pmatrix} \frac{\partial f}{\partial X_1} & \frac{\partial f}{\partial X_2} \\ \frac{\partial g}{\partial X_1} & \frac{\partial g}{\partial X_2} \end{pmatrix} \quad (2.10)$$

usualmente designados por expoentes de Lyapunov, através da resolução da equação característica

$$\det(\mathbf{J} - \lambda \mathbf{I}) = 0 \quad (2.11)$$

onde \mathbf{I} é a matriz identidade.

O sistema é estável se a parte real de todos os valores próprios for negativa, é instável se pelo menos uma parte real for positiva. Para outros casos é preciso análises mais elaboradas.

Para um sistema com n variáveis a análise é análoga, sendo que a matriz jacobiana é uma matriz de dimensão n .

2.1.4 Lei cinética: Sistemas S

Para concretizar a caracterização dum circuito metabólico precisa-se dum modelo cinético, que dê a variação temporal das concentrações das espécies.

Para uma reacção com dois substratos, X_1 e X_2 , normalmente assume-se a

lei cinética [13]

$$V(X_1, X_2) = \frac{V_{max}}{1 + \frac{K_{X_1}}{X_1} + \frac{K_{X_2}}{X_2} + \delta \frac{K_E K_{X_2}}{X_1 X_2}} \quad (2.12)$$

V_{max} é a velocidade máxima, K_{X_1} a constante de Michaelis para o substrato X_1 , K_{X_2} a constante de Michaelis para o substrato X_2 , K_E é a constante de equilíbrio de dissociação do complexo Enzima- X_1 , δ é uma constante que pode ser 0 ou 1, dependendo do mecanismo da reacção.

A forma dessa expressão de velocidade é pouco conveniente para estudos analíticos das propriedades de circuitos bioquímicos. Isto porque frequentemente não é possível obter soluções de estado estacionário analíticas mesmo para modelos de circuitos muito simples formulados com base em expressões deste tipo. Torna-se, portanto, proveitoso um uso de formalismos mais simples.

O formalismo dos Sistemas S, pela sua simplicidade, apresentam-se como boa alternativa.

No formalismo dos Sistemas S a taxa de variação da variável interna² i tem

²Na modelação, para simplificar as equações, em geral as variáveis externas são consideradas constantes

um termo de produção e outro de consumo dadas pela lei de potências

$$\frac{dX_i}{dt} = \alpha_i \prod_j X_j^{g_{ij}} - \beta_i \prod_k X_k^{h_{ik}} \quad (2.13)$$

O termo de produção é um produto de uma constante de velocidade α_i por potências de concentrações de todas as espécies que influenciam directamente a formação de X_i , seja como reagentes, inibidores ou activadores. O termo de consumo é o produto de uma constante cinética β_i por potências das concentrações de todas as espécies que influenciam directamente o consumo de X_i . g_{ij} e h_{ik} são ordens cinéticas generalizadas. A ordem cinética g_{ij} (h_{ij}) toma um valor positivo quando o efector X_j estimula a produção (ou consumo) de X_i e negativo quando inibe a produção (ou consumo) de X_i . No caso de enzimas com cinéticas de Michaelis-Menten, a ordem cinética com respeito a um substrato aproxima-se de 1 quando a enzima está muito insaturada com o substrato e de 0 quando está muito saturada (ver apêndice 5.2).

O formalismo dos sistemas S é fundamentado na aproximação das velocidades de consumo e produção em série de Taylor no espaço logaritimico. Exemplificando para duas variáveis tem-se

$$V = V(X_1, X_2) \quad (2.14)$$

Notando que $X_i = e^{Y_i}$, pode-se dizer que a velocidade é função de (Y_1, Y_2) ³

$$V = V(Y_1, Y_2) \quad (2.15)$$

e

$$\log V = f(Y_1, Y_2) \quad (2.16)$$

onde $f = \log V$

Expandindo a função em torno dum ponto $(a, b) = (Y_{10}, Y_{20})$ tem-se

$$\log V = \log V(a, b) + \frac{\partial f}{\partial Y_1|_{(a,b)}} (Y_1 - Y_{10}) + \frac{\partial f}{\partial Y_2|_{(a,b)}} (Y_2 - Y_{20}) + \dots \quad (2.17)$$

rearranjando,

$$\log V = \zeta + \frac{\partial f}{\partial Y_1|_{(a,b)}} Y_1 + \frac{\partial f}{\partial Y_2|_{(a,b)}} Y_2 \quad (2.18)$$

onde

$$\zeta = \log V(a, b) - \frac{\partial f}{\partial Y_1|_{(a,b)}} Y_{10} - \frac{\partial f}{\partial Y_2|_{(a,b)}} Y_{20} \quad (2.19)$$

Da equação (2.18), se obtém

$$V = \alpha X_1^{g_1} X_2^{g_2} \quad (2.20)$$

onde $\alpha = e^\zeta$, $g_1 = \frac{\partial f}{\partial Y_1|_{(a,b)}}$ e $g_2 = \frac{\partial f}{\partial Y_2|_{(a,b)}}$.

³desde que se exclui a possibilidade da concentração se anular por não existir logaritmo de zero.

Para pequenas variações do ponto (a, b) , a lei de potências é uma boa aproximação da lei cinética.

A aproximação de potências, portanto, é bem fundamentada e ajuda a lidar com elevada complexidade dos processos biológicos [12].

Com os formalismos quantificadores torna-se essencial saber identificar as propriedades relevantes dos circuitos a comparar. Essas propriedades serão os critérios de comparação.

2.2 Critérios de eficácia funcional de um CMTG

Que requisitos deve um CMTG preencher para ter uma elevada eficácia funcional?

Essa questão, embora nova para os biólogos, há muito tem sido colocada pelos engenheiros, referindo às fontes de alimentação energética, nos circuitos eléctricos, dispositivos que têm uma função análoga aos CMTG's no metabolismo [3].

A concentração do intermediário carregado, X_2 (análogo da voltagem numa fonte de alimentação eléctrica) deve ser fortemente tamponizado contra variações nas variáveis externas, nomeadamente:

- I. contra variações na concentração do aceitante, X_6 , o que é assegurado por um baixo ganho logaritmico de X_2 com X_6 , $|L_{26}|$.
- II. contra variações na concentração do dador, X_5 , o que é assegurado por um baixo ganho logaritmico de X_2 com X_5 , $|L_{25}|$.
- III. contra variações na concentração total do intermediário, X_7 , o que é assegurado por um baixo ganho logaritmico de X_2 com X_7 , $|L_{27}|$.

A concentração do intermediário carregado deve ter elevada robustez (baixa sensibilidade) a flutuações nas actividades enzimáticas:

- IV. da enzima de descarga de grupo, assegurada por uma baixa sensibilidade $|S(X_2, \alpha)|$
- V. da enzima de carga de grupo, o que é assegurado por uma baixa sensibilidade $|S(X_2, \beta)|$

A velocidade de transferência de grupo para o aceitante, v (análoga a corrente eléctrica) deve:

- VI. aumentar com a o aumento da concentração do aceitante, (uma boa fonte de alimentação deve aumentar o fornecimento de corrente sempre que preciso), o que é assegurado por um elevado ganho de v com respeito à X_6 , L_{v6} .

O tempo de resposta ou relaxação, deve ser:

VII. rápido (quando é preciso mais corrente não pode haver muito demora).

Esse critério é assegurado por um expoente de Lyapunov bastante negativo.

3

Resultados

3.1 Princípios de *Design* dum CMTG

Nesta secção investiga-se os princípios de design de um CMTG, por análise dos critérios já estabelecidos. Para isso, é necessário ter a expressão das propriedades sistémicas.

Nos sistemas S, o valor da variável X_i no estado estacionário, no espaço logaritmico é uma combinação linear das variáveis externas $\{Y_k\}$ e dos parâmetros $\{\log p\}$

$$Y_i = \sum_k L_{ik} Y_k + \sum_p S(X_i, p) \log p \quad (3.1)$$

Cada Y_k é pesado pelo ganho logaritmico L_{ik} e cada parâmetro pesado pela sensibilidade $S(X_i, p)$.

Para o ciclo referência a lei cinética é

$$\frac{dX_1}{dt} = \alpha X_2^{g_{12}} X_6^{g_{16}} - \beta X_1^{h_{11}} X_5^{h_{15}} \quad (3.2)$$

X_1 e X_2 são variáveis internas, pois o seu valor no estado estacionário é determinado pelas variáveis externas X_5 e X_6 .

No estado estacionário, depois de logaritmização, tem-se

$$\log \alpha + g_{12}Y_2 + g_{16}Y_6 = \log \beta + h_{11}Y_1 + h_{15}Y_5 \quad (3.3)$$

Para ter linearidade no espaço logaritimico, (eq.3.1), faz-se a expansão

$$X_2 = \gamma X_1^a X_7^b \quad (3.4)$$

onde

$$a = \frac{\partial Y_1}{\partial Y_2} = -\frac{q_1}{1 - q_1} \quad (3.5)$$

e

$$b = \frac{\partial Y_1}{\partial Y_7} = \frac{1}{1 - q_1} \quad (3.6)$$

com $q_1 = X_1/X_7$, a fracção de X_1 . γ é calculada com a condição $X_2 = (1 - q_1)X_7$.

A equação (3.4) pode ser reescrita como

$$Y_1 = -\frac{1}{a} \log \gamma - \frac{b}{a} Y_7 + \frac{b}{a} Y_2 \quad (3.7)$$

que depois de inserida em (3.3), tem-se Y_2 como a combinação linear pretendida

$$Y_2 = L_{26}Y_6 + L_{25}Y_5 + L_{27}Y_7 + S(X_2, \alpha) \log \alpha + S(X_2, \beta) \log \beta + L_{2\gamma} \log \gamma \quad (3.8)$$

Por simples álgebra se mostra que

$$L_{26} = \frac{-g_{16}q_1}{h_{11}(1 - q_1) + g_{12}q_1} \quad (3.9)$$

$$L_{25} = \frac{h_{15}q_1}{h_{11}(1 - q_1) + g_{12}q_1} \quad (3.10)$$

$$L_{27} = \frac{h_{11}}{h_{11}(1 - q_1) + g_{12}q_1} \quad (3.11)$$

$$S(X_2, \alpha) = -\frac{q_1}{h_{11}(1 - q_1) + g_{12}q_1} \quad (3.12)$$

e

$$S(X_2, \beta) = \frac{q_1}{h_{11}(1 - q_1) + g_{12}q_1} \quad (3.13)$$

No apêndice 5.1 está uma forma alternativa de calcular os ganhos logarítmicos e sensibilidades para o caso em estudo.

L_{25} e L_{27} são positivos, o que quer dizer que X_2 aumenta com X_5 e X_7 , L_{26} é negativo, X_2 diminui com X_6 .

A expressão do ganho da velocidade de transferência de grupo, v , com respeito a X_6 é

$$L_{v6} = g_{12}L_{26} + g_{16} \quad (3.14)$$

$$= \frac{g_{16}h_{11}(1 - q_1)}{h_{11}(1 - q_1) + g_{12}q_1} \quad (3.15)$$

sempre positivo.

Pela expressão dos ganhos e considerando os critérios de *performance* discutidos na secção anterior, pode-se extrair princípios de *design*.

Quer-se uma baixa perda de X_2 por ganho de fluxo de v de transferência de grupo, ou seja, a razão

$$\frac{L_{26}}{L_{v6}} = -\frac{q_1}{h_{11}(1 - q_1)} \quad (3.16)$$

deve ser baixa. Logo,

q_1 deve ser baixa e h_{11} elevado.

Ou seja, o intermediário deve estar predominantemente na forma carregada (q_1 baixo) e a enzima de carga, que catalisa a transferência do grupo para o intermediário descarregado, deve estar insaturada com este último substrato (h_{11} elevado).

Para haver uma forte tamponização do intermediário carregado com respeito a variações na concentração do dador, isto é um baixo $|L_{25}|$

h_{15} deve ser baixo.

Ou seja, a enzima de carga deve estar muito saturada com o dador.

Para haver um forte ganho na velocidade transferência de grupo com respeito a variações na concentração da demanda, isto é um alto $|L_{v6}|$, analisando a expressão (3.15) conclui-se que

g_{16} deve ser elevado.

Ou seja, a enzima de descarga, que catalisa a transferência do grupo para o aceitante deve estar muito insaturada com este último substrato.

3.2 Comparação do ciclo com sequestração do intermediário carregado com o ciclo referência

Nesta secção investiga-se as vantagens e desvantagens da sequestração do intermediário carregado, X_2 , apresentado na figura 3.1.

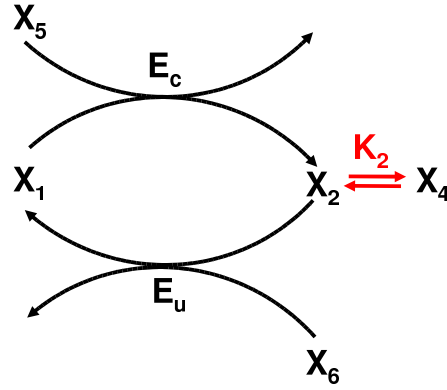


Figura 3.1: Ciclo com sequestração do intermediário carregado, ciclo s_2 e ciclo referência. X_4 é a forma sequestrada de X_1 , K_2 é a constante de equilíbrio aparente da sequestração.

Numa primeira parte a comparação é feita a concentração total do intermediário igual para os dois ciclos. Num cenário evolutivo simples, o ciclo s_2 aparece a partir do r , por mutação numa proteína que passa a ter especificidade para ligar ao intermediário carregado. Ou então o ciclo r pode surgir do ciclo do circuito com sequestração de X_2 por perda dessa especificidade.

Numa segunda parte, faz-se uma comparação controlada, onde a sequestração é acompanhada por um aumento da concentração total de intermediário, de tal modo que as concentrações de estado estacionário dos intermediários descarregado e carregado variem o menos possível do ciclo r para o ciclo s_2 .

3.2.1 Comparação entre os dois ciclos para uma concentração do intermediário total constante

As propriedades sistêmicas dos dois ciclos, equações (3.9-3.13) e (3.15), dependem das fracções dos intermediários e não propriamente das suas concentrações. Assim, para comparar os dois ciclos é necessário ter as relações entre as fracções estacionárias para os dois ciclos. Para isso, convém ter as equações estacionárias na forma de fracções.

A lei cinética para o ciclo referência é dada pelas seguintes duas equações,

$$\frac{dX_1}{dt} = \alpha X_2^{g_{12}} X_6^{g_{16}} - \beta X_1^{h_{11}} X_5^{h_{15}} \quad (3.17)$$

e

$$\frac{dX_2}{dt} = -\frac{dX_1}{dt} \quad (3.18)$$

A última equação garante que a soma $X_7 = X_1 + X_2$ é conservada.

Com $q'_i = \frac{X_i}{X_7}$ ($i = 1, 2$)¹, após dividir (3.17) por X_7 , tem-se

$$\frac{dq'_1}{dt} = \alpha q_2'^{g_{12}} X_7^{g_{12}-1} X_6^{g_{16}} - \beta q_1'^{h_{11}} X_7^{h_{11}-1} X_5^{h_{15}} \quad (3.19)$$

e

$$q'_1 + q'_2 = 1 \quad (3.20)$$

¹Sempre que aparece q em vez de q' significa que se está no estado estacionário.

Utilizando o facto de

$$q_2' = 1 - q_1' \quad (3.21)$$

obtêm-se uma única equação para o ciclo referência

$$\frac{dq_1'}{dt} = \alpha(1 - q_1')^{g_{12}} X_7^{g_{12}-1} X_6^{g_{16}} - \beta q_1'^{h_{11}} X_7^{h_{11}-1} X_5^{h_{15}} \quad (3.22)$$

Uma vantagem de ter a lei cinética na forma fraccionária é que uma fracção está no intervalo $[0,1]$ enquanto que uma concentração só tem que ser positiva.

Para o ciclo s_2 a equação (3.17) mantém-se. No entanto, a lei de conservação é diferente, pois o intermediário, para além de poder estar nas formas descarregada e carregada, ainda pode estar na forma carregada e sequestrada, X_4 :

$$q_1' + q_2' + q_4' = 1 \quad (3.23)$$

Assumindo o equilíbrio entre X_2 e sua forma sequestrada X_4 , isto é,

$$\frac{q_2'}{q_4'} = K_2 \quad (3.24)$$

de (3.23), tem-se que

$$q_2' = \frac{K_2}{K_2 + 1} (1 - q_1') \quad (3.25)$$

que depois de inserida em (3.22), surge a seguinte equação para o ciclo s_2

$$\frac{dq_1'}{dt} = \left(\frac{K_2}{K_2 + 1}\right)^{g_{12}} \alpha (1 - q_1')^{g_{12}} X_7^{g_{12}-1} X_6^{g_{16}} - \beta q_1'^{h_{11}} X_7^{h_{11}-1} X_5^{h_{15}} \quad (3.26)$$

Examinando as equações de evolução (3.22) e (3.26), a diferença está no factor $\frac{K_2}{K_2+1}$ que aparece no caso com sequestração. Para entender o significado físico deste factor, considere-se uma proteína P que sequestra X_2



X_4 é o complexo que se forma quando a proteína liga X_2 . No equilíbrio tem-se que

$$\frac{X_2 P}{X_4} = K_2' \quad (3.28)$$

K_2' é a constante de equilíbrio.

Ainda se pode escrever

$$\frac{X_2}{X_4} = K_2 \quad (3.29)$$

onde $K_2 = \frac{K_2'}{P}$. K_2 é uma constante de equilíbrio aparente, pois é razão duma constante de equilíbrio por uma concentração.

O factor $\frac{K_2}{K_2+1}$ corresponde a fração de X_2 livre,

$$\frac{X_2}{X_2 + X_4} = \frac{K_2}{K_2 + 1} \quad (3.30)$$

A condição de estacionaridade para ambos os ciclos é

$$\gamma \alpha (1 - q_1)^{g_{12}} X_7^{g_{12}-1} X_6^{g_{16}} = \beta q_1^{h_{11}} X_7^{h_{11}-1} X_5^{h_{15}} \quad (3.31)$$

onde γ é 1 para o ciclo de referência e $(\frac{K_2}{K_2+1})^{g_{12}}$ para o ciclo s_2 .

Define-se o factor R_2

$$R_2 = \frac{\beta X_7^{h_{11}-1} X_5^{h_{15}}}{\alpha X_7^{g_{12}-1} X_6^{g_{16}}} \quad (3.32)$$

A condição de estacionaridade é reescrita como

$$\gamma \frac{(1 - q_1)^{g_{12}}}{q_1^{h_{11}}} = R_2 \quad (3.33)$$

O factor R_2 em (3.32) é um factor ambiental já que o ambiente é representado pelo par (X_5, X_6) . Um valor estacionário q_1 representa todo o ambiente² - par (X_5, X_6) - que dá esse valor estacionário da fracção de X_1 . Usando os subscritos r para o ciclo r e s para o ciclo s_2 , de (3.33), tem-se

$$\frac{(1 - q_{1s})^{g_{12}}}{q_{1s}^{h_{11}}} = a \frac{(1 - q_{1r})^{g_{12}}}{q_{1r}^{h_{11}}} \quad (3.35)$$

onde $a = (\frac{K_2+1}{K_2})^{g_{12}} > 1$ Assim,

$$\frac{(1 - q_{1s})^{g_{12}}}{q_{1s}^{h_{11}}} > \frac{(1 - q_{1r})^{g_{12}}}{q_{1r}^{h_{11}}} \quad (3.36)$$

o que só se verifica se

$$q_{1s} < q_{1r} \quad (3.37)$$

²Se o par (X_5, X_6) dá o valor estacionário de q_1 todo o par (X'_5, X'_6) dá esse q_1 desde que

$$X'_6 = X_6 \left(\frac{X'_5}{X_5} \right)^{\frac{h_{15}}{g_{16}}} \quad (3.34)$$

O mesmo é dizer que

$$q_{2s} + q_{4s} > q_{2r} \quad (3.38)$$

A desigualdade (3.37) mostra que a sequestração do intermediário carregado diminui a concentração do intermediário descarregado livre. No entanto, é de esperar também que diminua a concentração do intermediário carregado livre. A equação (3.35) pode ser escrita como

$$\frac{q_{2s}^{g_{12}}}{q_{1s}^{h_{11}}} = \frac{q_{2r}^{g_{12}}}{q_{1r}^{h_{11}}} \quad (3.39)$$

que por causa de relação (3.37) se conclui que

$$q_{2s} < q_{2r} \quad (3.40)$$

Ou seja, a sequestração do intermediário carregado diminui tanto a concentração do intermediário descarregado como a do carregado livre.

Na figura 3.2 apresenta-se um estudo de q_1 estacionário para os dois casos, onde se utilizou valores particulares das constantes. A fracção estacionária de X_1 no ciclo referência, q_{1r} , varia de 0 a 1, varrendo assim todo o ambiente. Para cada q_1 , representativo dum ambiente, calcula-se a correspondente fracção estacionária de X_1 do ciclo s_2 , através da equação (3.35). Com q_{1r} e q_{1s} avaliam-se os ganhos L_{26} nos dois ciclos.

Verifica-se sempre $q_{1s} < q_{1r}$. Os dois casos aproximam-se com o aumento da

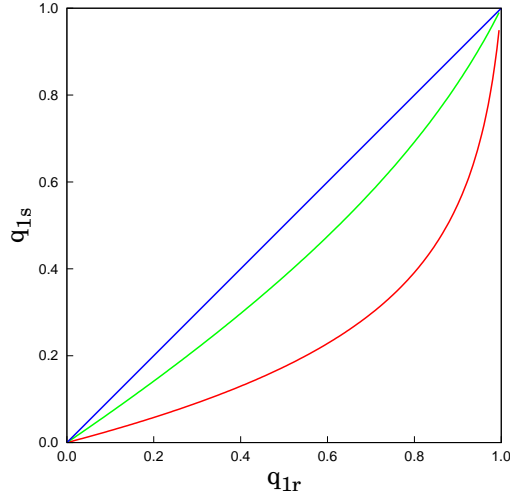


Figura 3.2: Comparação da fracção de intermediário na forma descarregada. Linha azul: função identidade; linha vermelha: $K_2 = 0.1$, ou seja, uma molécula do intermediário carregado para dez da sua forma sequestrada; linha verde: $K_2 = 1.0$, ou seja, relação de uma para uma. Os parâmetros são: $g_{12} = 0.5$, $h_{11} = 0.9$.

constante de equilíbrio, isto é, com a perda da sequestração.

Com as relações (3.37), (3.38) e (3.40), como se verá, tem-se a informação suficiente para comparar as propriedades sistêmicas dos dois ciclos.

Critério I: tamponização do intermediário carregado, X_2 , com respeito a variações na concentração do aceitante, X_6

O ganho logaritimico de X_2 com X_6 para o ciclo r e para o ciclo s_2 têm a mesma expressão:

$$L_{26} = \frac{-g_{16}q_1}{h_{11}(1 - q_1) + g_{12}q_1} \quad (3.41)$$

Daí segue que a razão entre os ganhos logaritmicos de X_2 com respeito a variações de X_6 para os dois ciclos é

$$\frac{L_{26}^s}{L_{26}^r} = \frac{g_{12} + h_{11} \frac{1-q_{1r}}{q_{1r}}}{g_{12} + h_{11} \frac{1-q_{1s}}{q_{1s}}} \quad (3.42)$$

que pode ser escrita como

$$\frac{L_{26}^s}{L_{26}^r} = \frac{g_{12} + h_{11} \frac{q_{2r}}{q_{1r}}}{g_{12} + h_{11} \frac{q_{2s}+q_{4s}}{q_{1s}}} \quad (3.43)$$

Pelas desigualdades (3.38) e (3.40) conclui-se que

$$L_{26}^s < L_{26}^r \quad (3.44)$$

e como ambos os ganhos são negativos se conclui que

$$|L_{26}^s| < |L_{26}^r| \quad (3.45)$$

A sequestração do intermediário carregado melhora a tamponização deste intermediário com respeito a variações na concentração do aceitante.

É o que se mostra na figura 3.3, num exemplo particular.

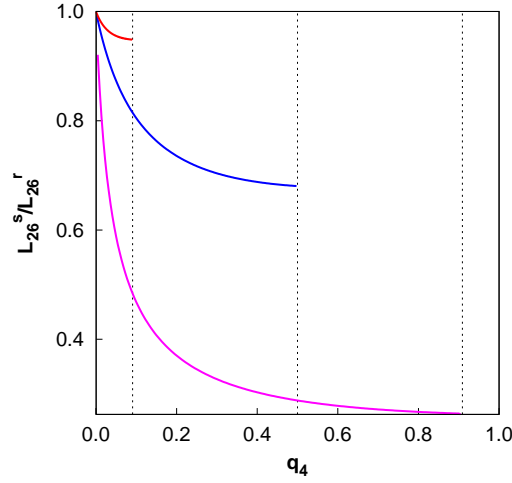


Figura 3.3: Comparação do ganho logaritimico L_{26} para os ciclos r e s_2 . Vermelho: $K_2 = 10$, Azul: $K_2 = 1.0$, Violeta: $K_2 = 0.1$. A linha a tracejado demarca o valor máximo de fracção de intermediário carregado dado por $\frac{1}{1+K_2}$. Os parâmetros são $g_{12} = 0.5$, $h_{11} = 0.9$, $g_{16} = 0.6$

Critério II: tamponização do intermediário carregado com respeito a variações do dador, X_5

O ganho logaritmico de X_2 com com respeito a variações de X_5 em ambos ciclos é

$$L_{25} = \frac{h_{15}q_1}{h_{11}(1 - q_1) + g_{12}q_1} \quad (3.46)$$

sempre positivo, mostrando que o intermediário carregado aumenta com a concentração do dador.

Comparando com a equação (3.41), nota-se que $|L_{25}|$ é directamente propor-

cional a $|L_{26}|$, logo, por (3.45) se prova que

$$|L_{25}^s| < |L_{25}^r| \quad (3.47)$$

A sequestração do intermediário carregado melhora a tamponização deste intermediário com respeito a variações na concentração do dador.

Critério III: tamponização do intermediário carregado, X_2 , com respeito a variações da concentração total de intermediário, X_7

O ganho L_{27} é, para os dois ciclos,

$$L_{27} = \frac{h_{11}}{h_{11}(1 - q_1) + g_{12}q_1} \quad (3.48)$$

pelo que

$$\frac{L_{27}^s}{L_{27}^r} = \frac{(1 - q_{1r}) + \frac{g_{12}}{h_{11}}q_{1r}}{(1 - q_{1s}) + \frac{g_{12}}{h_{11}}q_{1s}} \quad (3.49)$$

Já se mostrou na secção 3.1 que h_{11} deve ser elevado, tornando razoável admitir que $g_{12} \ll h_{11}$. Nessa condição ter-se-á

$$\frac{L_{27}^s}{L_{27}^r} = \frac{1 - q_{1r}}{1 - q_{1s}} \quad (3.50)$$

que por (3.37), se conclui que

$$|L_{27}^s| < |L_{27}^r| \quad (3.51)$$

A sequestração do intermediário carregado melhora a tamponização deste intermediário com respeito a variações na concentração total do intermediário.

Critério IV: Sensibilidade da concentração do intermediário carregado à actividade da enzima de descarga, α

A sensibilidade de X_2 à constante cinética α para os dois ciclos é

$$S(X_2, \alpha) = -\frac{q_1}{h_{11}(1 - q_1) + g_{12}q_1} \quad (3.52)$$

$|S(2, \alpha)|$ é proporcional a $|L_{26}|$. De acordo com (3.45)

$$|S(X_2, \alpha)^s| < |S(X_2, \alpha)^r| \quad (3.53)$$

A sequestração do intermediário carregado confere maior robustez (menor sensibilidade) desse intermediário à actividade da enzima de descarga

Critério V: Sensibilidade da concentração do intermediário carregado à actividade da enzima de carga, β

As sensibilidades de X_2 às actividades das enzimas de carga e descarga relacionam-se por

$$S(X_2, \beta) = -S(X_2, \alpha) \quad (3.54)$$

logo, por (3.53)

$$|S(X_2, \beta)^s| < |S(X_2, \beta)^r| \quad (3.55)$$

A sequestração do intermediário carregado confere maior robustez (menor sensibilidade) desse intermediário à actividade da enzima de carga

Critério VI: Ganho do fluxo de transferência de grupo para o aceitante, v , com respeito a variações na demanda, X_6

O ganho do fluxo de transferência de grupo para o aceitante com respeito a variações de X_6 é

$$L_{v6} = g_{12}L_{26} + g_{16} \quad (3.56)$$

Atendendo ao facto de

$$L_{26}^r < L_{26}^s \quad (3.57)$$

se tem

$$L_{v6}^s > L_{v6}^r \quad (3.58)$$

e sendo ambos ganhos positivos, conclui-se que

$$|L_{v6}^s| > |L_{v6}^r| \quad (3.59)$$

A sequestração do intermediário carregado melhora o ganho do fluxo de transferência de grupo para o aceitante com respeito a variações na demanda.

Na figura 3.4 apresenta-se um exemplo concreto.

Critério VII: tempo de relaxação

A fim duma melhor compreensão do tempo de relaxação, na figura 3.5 mostra-se uma simulação temporal da fracção q_2 para os ciclos r e s_2 .

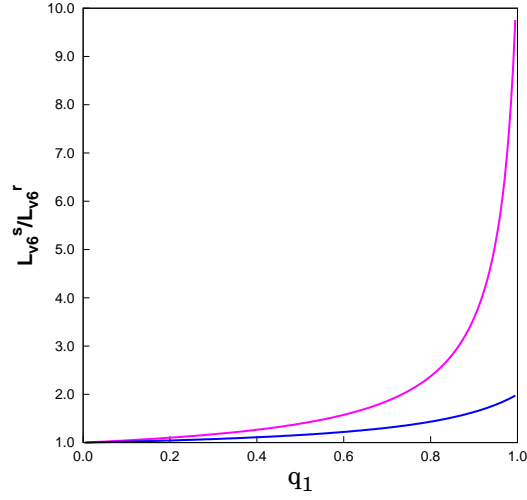


Figura 3.4: Comparação do ganho da velocidade de transferência de grupo para o aceitante com respeito a variações na demanda. linha violeta: $K_2 = 0.1$, linha azul: $K_2 = 1.0$. Os parâmetros são $g_{12} = 0.5$, $h_{11} = 0.9$, $g_{16} = 0.6$

O sistema começa num estado estacionário, no instante $t = 3$, o sistema é perturbado com um aumento instantâneo de X_6 . O sistema avança para novo estado estacionário. O tempo que cada ciclo leva a transitar de estado é diferente.

Para comparar esses dois tempos, utiliza-se o expoente de Lyapunov, pois quanto mais negativo for λ mais rapidamente se atinge o novo estado estacionário.

A expressão do expoente de Lyapunov para os dois ciclos é

$$\lambda = -q_1^{-1+h_{11}} \frac{(h_{11}(1-q_1) + g_{12}q_1)}{1-q_1} X_5^{h_{15}} X_7^{-1+h_{11}} \beta \quad (3.60)$$

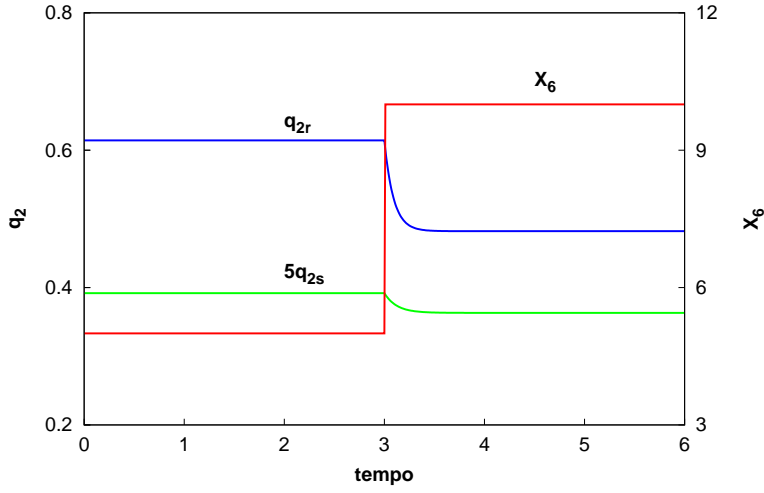


Figura 3.5: Simulação temporal da fracção de X_2 com e sem sequestração: os parâmetros são $X_7 = 3.1$, $X_5 = 4.0$, $g_{16} = 0.6$, $g_{12} = 0.5$, $h_{11} = 1.0$, $h_{15} = 0.8$, $\alpha = 2.4$ e $\beta = 2.4$, $K_2 = 0.1$. X_6 é instantaneamente aumentado de 5 para 10.

O valor negativo de λ garante a estabilidade do estado estacionário para os dois ciclos.

Segue que

$$\frac{\lambda_r}{\lambda_s} = \left(\frac{q_{1r}}{q_{1s}} \right)^{-1+h_{11}} \frac{L_{v6}^s}{L_{v6}^r} \quad (3.61)$$

de acordo com (3.15). Com a condição de $h_{11} \rightarrow 1$, a equação (3.61) reduz-se a

$$\frac{\lambda_r}{\lambda_s} = \frac{L_{v6}^s}{L_{v6}^r} \quad (3.62)$$

Pela desigualdade (3.58) segue que:

$$\lambda_{ref} < \lambda_{seq} \quad (3.63)$$

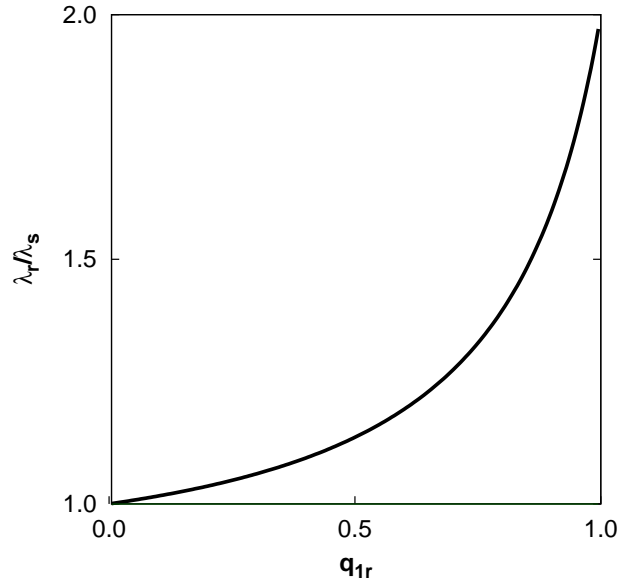


Figura 3.6: Comparação do expoente de Lyapunov para os ciclos com e sem sequestração. Os parâmetros são $h_{11} = 1.0$, $g_{12} = 0.5$, $g_{16} = 0.6$, $K = 1.0$

A sequestração do intermediário carregado aumenta o tempo de relaxação.

Na figura 3.6 apresenta-se um exemplo particular.

O significado do equilíbrio entre o intermediário carregado livre e sua forma sequestrada

Durante a análise assumiu-se que X_2 e X_4 estão em equilíbrio. Nesta secção analisa-se o significado desse equilíbrio e apresenta-se uma explicação qualitativa para o aumento do tempo de resposta no ciclo s_2 .

Suponha-se uma situação de estado estacionário que é perturbado, por exemplo, por um aumento de X_6 , impondo um novo estado estacionário. Na evolução para o novo estado estacionário, para o ciclo referência X_2 tem duas variações, uma de consumo e outra de produção. Já para o ciclo com sequestração a variação de X_2 tem três variações, uma de consumo (v^+), uma de produção (v^-) e outra de ajuste de equilíbrio (v^{eq}), representando o balanço da sequestração e perda de sequestração de X_2 . A taxa de variação de X_2 , portanto, é

$$\frac{dX_2}{dt} = v^+ + v^- + v^{eq} = v^{+-} + v^{eq} \quad (3.64)$$

Para o sistema permanecer no equilíbrio, X_2 tem de ser repostado por perda de sequestração sempre que diminua e ser sequestrado sempre que aumenta. Assim, v^{eq} é dependente e tem o sinal contrário de v^{+-} , o que implica terem efeitos contrários, o que explica em parte, o atraso do tempo que o ciclo s_2 leva a alcançar o novo estado estacionário.

Partindo dum situação de equilíbrio no tempo t , $\frac{X_2(t)}{X_4(t)} = K_2$, após um intervalo de tempo Δt , a manutenção no equilíbrio é garantida pela condição

$$\frac{X_2(t + \Delta t)}{X_4(t + \Delta t)} = \frac{X_2(t) + (v^{+-} + v^{eq})\Delta t}{X_4(t) - v^{eq}\Delta t} = K_2 \quad (3.65)$$

Donde segue que

$$v^{eq} = -\frac{1}{1 + K_2}v^{+-} \quad (3.66)$$

confirmando que v^{eq} e v^{+-} são dependentes e têm sinais contrários.

3.2.2 Comparação controlada a concentrações equivalentes de intermediário descarregado

Na secção anterior comparou-se os dois ciclos com a condição de a soma total de intermediário ser constante. No entanto, uma mutação que originasse a sequestração de X_2 poderia ser prejudicial por diminuir as concentrações dos intermediários descarregado e carregado livre abaixo dos valores a que outros processos celulares estariam adaptados. Neste cenário evolutivo em que existiria uma forte pressão selectiva para a conservação das concentrações de X_1 e/ou X_2 , a sequestração poderia evoluir numa sequência de passos mutacionais mutuamente compensatórios que alternadamente causariam um pequeno aumento da sequestração e um pequeno aumento da quantidade total de intermediário repondo aproximadamente as concentrações ancestrais de X_1 e X_2 . Coloca-se a questão de saber se a sequestração em condições em que as concentrações de X_1 e X_2 são semelhantes às do sistema de referência apresenta vantagens funcionais que favoreçam a sua manutenção evolutiva. Investigámos essa questão através de uma comparação controlada [10, 14, 15] em que a sequestração é acompanhada por um aumento da concentração total de intermediário no ciclo com sequestração tal que as concentrações de X_1 e

X_2 estejam próximas nos dois ciclos e se possa considerar que

$$X_{1s} = X_{1r} \quad (3.67)$$

e

$$X_{2s} = X_{2r} \quad (3.68)$$

Na gíria da Teoria de Sistemas Bioquímicos, as duas condições (3.67) e (3.68) designam-se por condições de equivalência externa [10, 14, 15]. A concentração total do intermediário no ciclo referência continua a ser X_7

$$X_7 = X_{1r} + X_{2r} \quad (3.69)$$

enquanto que a concentração total de intermediário no ciclo s_2 passa a ser

$$X_8 = X_{1s} + X_{2s} + X_{4s} \quad (3.70)$$

Com as condições (3.67) e (3.68) tem-se

$$q_{1s} = \frac{X_7}{X_8} q_{1r} \quad (3.71)$$

e

$$q_{2s} = \frac{X_7}{X_8} q_{2r} \quad (3.72)$$

Porque $X_7 < X_8$,

$$q_{1s} < q_{1r} \quad (3.73)$$

Mostrou-se na secção anterior que o facto de a sequestração baixar a fracção de intermediário na forma descarregada, explica os resultados da comparação

dos dois ciclos quanto aos critérios I a VI. Com a comparação controlada, continua-se a ter a mesma situação de decréscimo da fracção de intermediário na forma descarregada, equação (3.73), assim, as mesmas conclusões da comparação quanto aos critérios I a VI. Além disso a equação (3.60) mostra que o expoente de Lyapunov não depende da concentração de intermediário total com a condição $h_{11} \rightarrow 1$, pelo que a conclusão quanto ao critério também é a mesma.

Tendo-se mostrado que ambos os cenários de evolução da sequestração têm consequências funcionais qualitativamente semelhantes, falta saber se quantitativamente o aumento da concentração de intermediário total traz ganhos de *performance*. Para isso acontecer o decréscimo em q_1 , devido à sequestração de X_2 , no caso da comparação controlada terá de ser maior.

Com a condição de aumento de concentração total do intermediário, isto é, $X_8 = \mu X_7$ onde $\mu > 1$, em vez da equação (3.35) tem-se

$$\frac{(1 - q_{1s})^{g_{12}}}{q_{1s}^{h_{11}}} = ad \frac{(1 - q_{1r})^{g_{12}}}{q_{1r}^{h_{11}}} \quad (3.74)$$

onde $a = (\frac{K_2+1}{K_2})^{g_{12}} > 1$ e $d = \mu^{h_{11}-g_{12}}$. Se $h_{11} > g_{12}$, como deve verificar-se para o circuito apresentar boa performance (ver Secção 3.1), então $d > 1$.

Porque o produto ad tal como a na equação é maior do que 1, continua-se a

ter a desigualdade

$$q_{1s} < q_{1r} \quad (3.75)$$

mas a diferença

$$q_{1r} - q_{1s} \quad (3.76)$$

é agora mais acentuada. Por outras palavras, com o aumento da concentração total de intermediário, a sequestração de X_2 causa um maior decréscimo na fracção de X_1 , resultando que a melhoria da eficácia devida à esta sequestração é ainda maior.

Tendo a sensibilidade do intermediário carregado à actividade enzima de descarga, $S(X_2, \alpha)$ como exemplo, na figura 3.7 se apresenta esse comportamento. Com o aumento da concentração total do intermediário, $S(X_2, \alpha)^s$ é cada vez mais baixo do que $S(X_2, \alpha)^r$.

A sequestração do intermediário carregado melhora a eficácia funcional e a melhoria é ainda maior se a sequestração for acompanhada por um aumento na concentração total do intermediário.

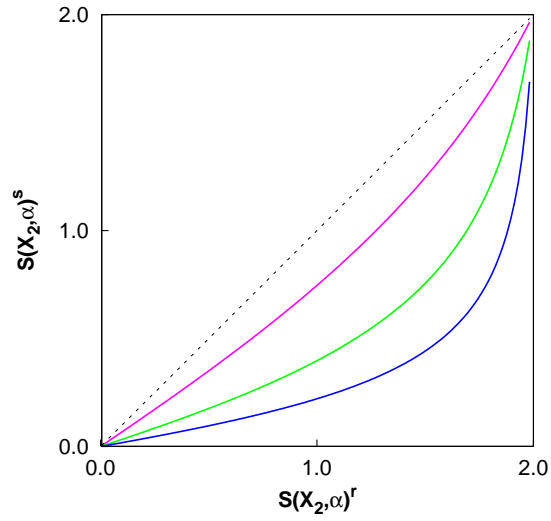


Figura 3.7: O efeito do aumento da quantidade total de intermediário no ciclo s_2 na sensibilidade do intermediário carregado à actividade da enzima de descarga. A linha violeta corresponde ao caso em que há sequestração mas a quantidade de intermediário total é mantida. linha verde: $X_8 = 5X_7$, linha azul: $X_8 = 20X_7$. Os parâmetros são $h_{11} = 1.0$, $g_{12} = 0.5$, $K_2 = 1.0$.

3.3 Comparação entre o ciclo com sequestração do intermediário descarregado e o ciclo referência

Nas secções anteriores mostrou-se que a sequestração do intermediário carregado melhora aspectos importantes da performance dos CMTG's, o que poderá explicar a prevalência biológica deste fenómeno. Mas além da sequestração de intermediário carregado observa-se também nos sistemas metabólicos alguma sequestração do intermediário descarregado. Para averiguar as consequências funcionais deste tipo de sequestração, nesta secção do trabalho comparamos o ciclo referência com o ciclo com sequestração do intermediário descarregado, X_1 - ciclo s_1 - representado, figura 3.8.

Tal como no caso anterior, considere-se que X_1 está em equilíbrio com a sua forma sequestrada X_3 , isto é, $\frac{X_1}{X_3} = K_1$.

A comparação também é feita em dois cenários evolutivos. Num primeiro cenário considere-se que a concentração total de intermediário se mantém com o surgimento do *design* alternativo. Num segundo cenário a sequestração do intermediário descarregado é acompanhada por um aumento da concentração total de intermediário, de modo que as concentrações dos intermediários variem o menos possível de um ciclo para outro.

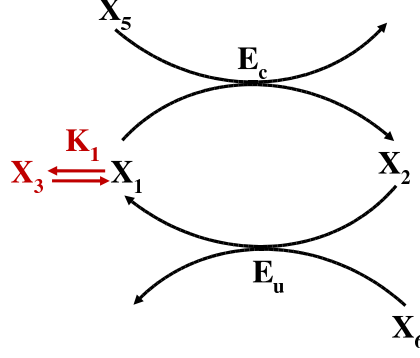


Figura 3.8: Ciclo com sequestração do intermediário descarregado, ciclo s_1 e ciclo referência. X_3 é a forma sequestrada de X_1

3.3.1 Comparação a concentração do intermediário total constante

No caso anterior centrou-se na lei de evolução de X_1 , nesta secção centra-se na evolução de X_2 porque a expressão é a mesma para os ciclos r e s_1 , dada por

$$\frac{dX_2}{dt} = \beta X_1^{h_{11}} X_5^{h_{15}} - \alpha X_2^{g_{12}} X_6^{g_{16}} \quad (3.77)$$

Na forma fraccionária as leis cinéticas são

$$\frac{dq_2'}{dt} = \phi \beta (1 - q_2')^{h_{11}} X_7^{h_{11}-1} X_5^{h_{15}} - \alpha q_2'^{g_{12}} X_7^{g_{12}-1} X_6^{g_{16}} \quad (3.78)$$

onde $\phi = (\frac{K_1}{K_1+1})^{h_{11}}$ para o ciclo s_1 e 1 para o ciclo r . Para o ciclo referência

$$q_2' = \frac{X_2}{X_1 + X_2} \quad (3.79)$$

e para o ciclo s_1

$$q_2' = \frac{X_2}{X_1 + X_2 + X_3} \quad (3.80)$$

Definindo R_1 por

$$R_1 = \frac{\alpha X_7^{g_{12}-1} X_6^{g_{16}}}{\beta X_7^{h_{11}-1} X_5^{h_{15}}} \quad (3.81)$$

a condição de estacionaridade para os dois ciclos é

$$\phi \frac{(1 - q_2)^{h_{11}}}{q_2^{g_{12}}} = R_1 \quad (3.82)$$

Seja q_{2s} a fracção de X_2 no ciclo s_1 e q_{2r} a fracção de X_2 no ciclo r tem-se

$$\frac{(1 - q_{2s})^{h_{11}}}{q_{2s}^{g_{12}}} = b \frac{(1 - q_{2r})^{h_{11}}}{q_{2r}^{g_{12}}} \quad (3.83)$$

onde $b = (\frac{K_1+1}{K_1})^{h_{11}} > 1$, logo

$$\frac{(1 - q_{2s})^{h_{11}}}{q_{2s}^{g_{12}}} > \frac{(1 - q_{2r})^{h_{11}}}{q_{2r}^{g_{12}}} \quad (3.84)$$

o que só se verifica caso

$$q_{2s} < q_{2r} \quad (3.85)$$

A relação (3.85) é equivalente a

$$q_{1s} + q_{3s} > q_{1r} \quad (3.86)$$

As relações (3.85) e (3.86) serão úteis na comparação dos ciclos.

Critério I: tamponização do intermediário carregado com respeito a variações na concentração do aceitante

O ganho logaritmico L_{26} para o ciclo s_1 é

$$L_{26} = \frac{-g_{16}(1 - q_2)}{h_{11}q_2 + g_{12}(1 - q_{12})} \quad (3.87)$$

A expressão é a mesma para o ciclo referência, equação (3.9) desde que q_1 seja substituído por $q_{13} = q_1 + q_3$.

$$L_{26} = \frac{-g_{16}q_{13}}{h_{11}(1 - q_{13}) + g_{12}q_{13}} \quad (3.88)$$

Deste modo,

$$\frac{L_{26}^s}{L_{26}^r} = \frac{g_{12} + h_{11} \frac{1-q_{1r}}{q_{1r}}}{g_{12} + h_{11} \frac{1-q_{13s}}{q_{13s}}} \quad (3.89)$$

Por (3.86) se conclui que

$$|L_{26}^s| > |L_{26}^r| \quad (3.90)$$

A sequestração do intermediário descarregado diminui a tamponização do intermediário carregado com respeito a variações na concentração do aceitante.

Critério II: tamponização do intermediário carregado com respeito a variações na concentração do dador

O ganho de X_2 com X_5 é

$$L_{25} = \frac{h_{15}q_{13}}{h_{11}(1 - q_{13}) + g_{12}q_{13}} \quad (3.91)$$

que por ser proporcional a L_{26} e atendendo a (3.90), se conclui que

$$|L_{25}^s| > |L_{25}^r| \quad (3.92)$$

A sequestração do intermediário descarregado diminui a tamponização do intermediário carregado com respeito a variações na concentração do dador.

Critério III: tamponização do intermediário carregado com respeito à variações na concentração total de intermediário

O ganho L_{27} é

$$L_{27} = \frac{h_{11}}{h_{11}(1 - q_{13}) + g_{12}q_{13}} \quad (3.93)$$

Com a condição $g_{12} \ll h_{11}$ tem-se que

$$\frac{L_{27}^s}{L_{27}^r} = \frac{1 - q_{1r}}{1 - q_{13s}} = \frac{q_{2r}}{q_{2s}} \quad (3.94)$$

De acordo com (3.85),

$$|L_{27}^s| > |L_{27}^r| \quad (3.95)$$

A sequestração do intermediário descarregado diminui a tamponização do intermediário carregado com respeito a variações na concentração total do intermediário.

Critério IV: Sensibilidade da concentração do intermediário carregado à actividade da enzima de descarga, α

A sensibilidade de X_2 à constante cinética α para o ciclo s_1 é

$$S(X_2, \alpha) = -\frac{q_{13}}{h_{11}(1 - q_{13}) + g_{12}q_{13}} \quad (3.96)$$

Devido à proporcionalidade

$$S(X_2, \alpha)^r \propto L_{26}^r \quad (3.97)$$

obtem-se, de acordo com (3.90),

$$|S(X_2, \alpha)^s| > |S(X_2, \alpha)^r| \quad (3.98)$$

A sequestração do intermediário descarregado confere menor robustez (maior sensibilidade) da concentração do intermediário carregado com respeito à actividade da enzima de descarga.

Critério V: Sensibilidade da concentração do intermediário carregado à actividade da enzima de descarga

As sensibilidades de X_2 às constantes cinéticas β e α relacionam-se por

$$S(X_2, \beta) = -S(X_2, \alpha) \quad (3.99)$$

logo, por (3.100)

$$|S(X_2, \beta)^s| > |S(X_2, \beta)^r| \quad (3.100)$$

A sequestração do intermediário descarregado confere menor robustez (maior sensibilidade) da concentração do intermediário carregado à actividade da enzima de carga.

Critério VI: Ganho do fluxo de transferência de grupo com respeito à variações na concentração do aceitante

O ganho L_{v6} para o ciclo s_1 é

$$L_{v6} = g_{12}L_{26} + g_{16} \quad (3.101)$$

$$= \frac{g_{16}h_{11}(1 - q_{13})}{h_{11}(1 - q_{13}) + g_{12}q_{13}} \quad (3.102)$$

valor sempre positivo. Usando (3.90) e (3.101) se obtem

$$|L_{v6}^s| < |L_{v6}^r| \quad (3.103)$$

A sequestração do intermediário descarregado, X_1 diminui o ganho do fluxo de transferência de grupo com respeito à variações na concentração do aceitante.

Critério VII: tempo de relaxação

O expoente Lyapunov para o ciclo s_1 é

$$\lambda = -q_1^{-1+h_{11}} \frac{(h_{11}(1 - q_{13}) + g_{12}q_{13})}{1 - q_{13}} X_5^{h_{15}} X_7^{-1+h_{11}} \beta \frac{K_1}{K_1 + 1} \quad (3.104)$$

$$\frac{\lambda_s}{\lambda_r} = \left(\frac{q_{1s}}{q_{1r}}\right)^{-1+h_{11}} \frac{L_{v6}^r}{L_{v6}^s} \frac{K_1}{K_1 + 1} \quad (3.105)$$

Com a condição de $h_{11} = 1$, tem-se

$$\frac{\lambda_s}{\lambda_r} = \frac{L_{v6}^r}{L_{v6}^s} \frac{K_1}{K_1 + 1} \quad (3.106)$$

O primeiro factor de (3.106) é menor do que 1 de acordo com (3.103) enquanto que o segundo factor é maior do que 1.

Na figura 3.9 mostra-se que a decisão sobre o ciclo com melhor tempo de relaxação depende do ambiente.

Para ambientes com baixos valores de q_{2r} , o ciclo referência responde mais depressa e para ambientes com elevados valores de q_{2r} a situação inverte.

3.3.2 Comparação controlada a concentrações equivalentes de intermediário carregado

Nesta secção faz-se a comparação controlada do ciclo referência com o ciclo com sequestração do intermediário descarregado. Da mesma maneira, no ciclo com sequestração há um aumento na concentração total de intermediário, que em vez de X_7 , passa a X_9 , de modo que as concentrações estacionárias de X_1 e X_2 , difiram o menos possível e se possa considerar que

$$X_{is} = X_{ir} \quad i = 1, 2 \quad (3.107)$$

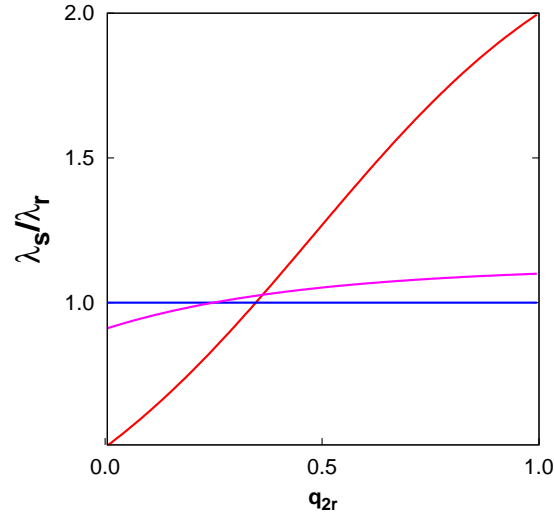


Figura 3.9: Comparação do expoente Lyapunov para o ciclos r e s_1 . A decisão sobre o ciclo com melhor tempo de relaxação depende do ambiente. Vermelho: $K_1 = 1.0$, Violeta: $K_1 = 10.0$. Os parâmetros são $g_{12} = 0.5$, $g_{16} = 0.6$, $h_{11} = 1.0$

A concentração total de intermediário no ciclo s_1 é X_9

$$X_9 = X_{1s} + X_{2s} + X_{3s} \quad (3.108)$$

Com as condições (3.107) se mostra que

$$q_{2s} = \frac{X_7}{X_9} q_{2r} \quad (3.109)$$

Porque $X_7 < X_9$, se tem que

$$q_{2s} < q_{2r} \quad (3.110)$$

Ou seja, na comparação controlada, a sequestração do intermediário descarregado também diminui a fracção de intermediário na forma carregada.

Portanto, os dois cenários evolutivos, com e sem equivalência externa, têm

os mesmos resultados referentes a todos os critérios. Em ambos os casos, a sequestração do intermediário descarregado diminui a eficácia funcional, ao diminuir as tamponizações do intermediário carregado, aumentar as sensibilidades desse intermediário e ao diminuir o acoplamento entre a demanda e o fluxo de fornecimento de grupo.

O expoente de Lyapunov, com a condição de $h_{11} \rightarrow 1$, não depende da concentração total de intermediário, portanto o ciclo s_1 , em ambos os cenários evolutivos, continua a não melhorar nem piorar o tempo de resposta.

4

Discussão

O trabalho incidiu sobre um dos circuitos elementares mais prevalentes em redes metabólicas, nomeadamente, os ciclos metabólicos de transferência de grupos, CMTG's.

Um CMTG é um conjunto de reacções químicas acopladas, catalisadas por enzimas, que transfere um grupo molecular dum dador para um aceitante via um intermediário químico reciclado.

Tem-se observado que alguns dos principais intermediários recirculados que medeiam a transferência de grupos são sequestrados. Esta sequestração está especialmente bem documentada para o caso do $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ em eritrócitos humanos [7] onde se estima que cerca de 90% do NADP^+ e 64% do NADPH estejam sequestrados por proteínas. Este grau de sequestração não

é explicável simplesmente pela formação de complexos enzima-substrato envolvendo o NADPH, tanto mais que o NADPH não participa activamente na função de uma das principais proteínas sequestrantes, a deoxi-hemoglobina. Como discutido na Introdução, na ausência de vantagens funcionais que me-deiem a sua manutenção evolutiva a sequestração seria rapidamente perdida devido a entropia mutacional. Coloca-se por isso a questão de saber se existi-rão vantagens funcionais intrínsecas que justifiquem a manutenção evolutiva da sequestração de intermediários recirculados.

Como preliminar necessário ao esclarecimento desta questão, numa primeira parte do trabalho investigou-se os Princípios de *Design* dum CMTG, ou seja, as regras que conferem a um CMTG a eficácia funcional, o que exigiu saber que requisitos um CMTG deve preencher para funcionar eficazmente.

Recorrendo a analogia que um CMTG tem com uma fonte de alimenta-ção num circuito eléctrico, estabeleceu-se critérios de eficácia funcional dum CMTG. Numa primeira categoria, requereu-se que um CMTG devia fornecer o grupo químico (análogo da corrente eléctrica) à velocidade exigida e man-ter a concentração do intermediário carregado (análogo da voltagem) quase constante. Numa segunda categoria, interessou os aspectos temporais, ao requerer um tempo de relaxação baixo. Numa situação em que dois ciclos têm a mesma resposta em relação à primeira categoria, isto é, a perturbação

é retirada, o ciclo com menor tempo de relaxação tem uma melhor eficácia funcional.

Quanto aos Princípios de *Design*, deduziu-se que para um CMTG operar eficazmente há uma série de requisitos a preencher, nomeadamente:

- o intermediário deve estar predominantemente na forma carregada
- a enzima de carga deve estar saturada com o dador
- a enzima de descarga deve estar saturada com o intermediário carregado e insaturada com o aceitante.

Estes princípios foram verificados em trabalhos anteriores por Salvador e Savageau [6, 7] que analisaram em detalhe ciclos metabólicos celulares concretos. Recentemente, Coelho *et al* [3] deduziu os mesmos princípios, num trabalho onde não se apela às mesmas aproximações do nosso método. Assim, a aproximação utilizada neste trabalho, concretamente a representação da velocidade de consumo (produção) como uma potência de concentrações, para além de ser válida para pequenas perturbações nas variáveis externas, não é inadequada para tecer conclusões para perturbações maiores.

De seguida comparou-se a eficácia funcional de diferentes *design's* de CMTG.

A partir do ciclo referência, construíram-se dois ciclos alternativos, um ciclo

em que o intermediário carregado é sequestrado e outro ciclo em que o intermediário descarregado é sequestrado.

Com os critérios de *performance* já estabelecidos procedeu-se à comparação dos três ciclos.

Cada comparação foi feita em dois cenários evolutivos.

Num primeiro cenário, a concentração total de intermediário foi a mesma para os dois ciclos. Fisicamente, este cenário traduz a emergência, numa população de células referência, de uma mutação numa proteína que passa a ligar o intermediário.

Um segundo cenário aparece porque o surgimento da sequestração diminui as concentrações dos dois intermediários abaixo dos valores a que outros processos estariam adaptados, havendo, portanto, pressão selectiva para manter as concentrações dos intermediários. Torna-se, por isso, importante acompanhar a sequestração por um aumento na quantidade total de intermediário de modo a se poder considerar que as concentrações do intermediário nas formas descarregada e carregada, difiram o menos possível.

Os dois cenários evolutivos levaram a resultados qualitativamente semelhan-

tes.

A sequestração do intermediário carregado em relação aos outros *design's* tem as seguintes vantagens funcionais:

- uma maior tamponização do intermediário carregado com respeito a variações nas concentrações do dador, do aceitante e do intermediário total
- maior robustez (menor sensibilidade) às actividades das enzimas de carga e descarga
- maior ganho de fluxo de transferência de grupo para o aceitante com respeito a variações na concentração do aceitante

No entanto, a sequestração deste intermediário tem a desvantagem de aumentar o tempo de resposta.

Mostrou-se que com o aumento da concentração total de intermediário há um acentuamento das diferenças entre os ciclos.

Resumindo, a sequestração do intermediário carregado melhora os aspectos relacionados com variações nas propriedades estacionárias e piora os aspectos temporais. Numa hipótese extrema em que os tempos de resposta estejam

numa escala menor do que os tempos de outros processos acoplados, o aspecto temporal do ciclo deixa de ter importância, então o ciclo s_2 é mais eficaz. Noutra hipótese extrema em que o estímulo é aplicado e retirado, o sistema volta ao mesmo estado estacionário, logo só o aspecto temporal interessa e o ciclo r passa a ser mais eficaz.

A sequestração do intermediário descarregado, ao invés, é uma desvantagem, pois diminui as tamponizações, as sensibilidades e o acoplamento entre a demanda e fluxo de transferência de grupo para o aceitante.

A tabela 4.1 apresenta a expressão matemática de cada propriedade sistémica que serviu de critério de comparação enquanto que na tabela 4.2 mostra-se o resumo dos resultados.

Quanto à perspectivas futuras, pretende-se incluir nos estudos outros critérios. Por exemplo, a especificidade química dos intermediários. Para dar um exemplo concreto, no ciclos que envolvem a glutathione, um critério que devia ser levado em conta era a baixa concentração da glutathione oxidada, que é tóxica para a célula. Uma outra questão intrigante é saber se os ciclos são desenhados no sentido de diminuir a quantidade de enzima necessária. Isto porque havendo diferentes formas de ter a mesma eficácia funcional, a forma que exige menor quantidade de enzima expressa tem vantagem selec-

tiva.

Futuramente também se pretende estudar outros *design's* de CMTG's que aparecem na célula.

Tabela 4.1: Expressão matemática das propriedades sistêmicas

	ciclos r e s_2	ciclo s_1
L_{26}	$\frac{-g_{16}q_1}{h_{11}(1-q_1)+g_{12}q_1}$	$\frac{-g_{16}q_{13}}{h_{11}(1-q_{13})+g_{12}q_{13}}$
L_{25}	$\frac{h_{15}q_1}{h_{11}(1-q_1)+g_{12}q_1}$	$\frac{h_{15}q_{13}}{h_{11}(1-q_{13})+g_{12}q_{13}}$
L_{27}	$\frac{h_{11}}{h_{11}(1-q_1)+g_{12}q_1}$	$\frac{h_{11}}{h_{11}(1-q_{13})+g_{12}q_{13}}$
L_{v6}	$\frac{h_{11}(1-q_1)}{h_{11}(1-q_1)+g_{12}q_1}$	$\frac{h_{11}(1-q_{13})}{h_{11}(1-q_{13})+g_{12}q_{13}}$
$S(X_2, \alpha)$	$\frac{-q_1}{h_{11}(1-q_1)+g_{12}q_1}$	$\frac{-q_{13}}{h_{11}(1-q_{13})+g_{12}q_{13}}$
$S(X_2, \beta)$	$\frac{q_1}{h_{11}(1-q_1)+g_{12}q_1}$	$\frac{q_{13}}{h_{11}(1-q_{13})+g_{12}q_{13}}$
$\frac{\lambda}{X_5^{h_{15}} X_7^{-1+h_{11}} \beta}$	$\frac{-q_1^{-1+h_{11}}(h_{11}(1-q_1)+g_{12}q_1)}{1-q_1}$	$\frac{-q_1^{-1+h_{11}}(h_{11}(1-q_{13})+g_{12}q_{13})}{1-q_{13}} \frac{K_1}{K_1+1}$
Ciclo r : $q_i = \frac{X_1}{X_1+X_2}$, ciclo s_2 : $q_i = \frac{X_i}{X_1+X_2+X_4}$, ciclo s_1 : $q_i = \frac{X_i}{X_1+X_2+X_3}$,		

$$q_{13} = q_1 + q_3$$

Tabela 4.2: Comparação dos ciclos

	L_{26}	L_{25}	L_{27}	L_{v6}	$S(X_2, \alpha)$	$S(X_2, \beta)$	λ
ciclo s_2	+	+	+	+	+	+	—
ciclo s_1	—	—	—	—	—	—	a

+ : melhor que o ciclo referência, — : pior que o ciclo referência, a: dependente

do ambiente

5

Apêndices

5.1 Ganho logaritmico de X_2 com respeito a

$$X_6$$

Neste apêndice, tendo como exemplo, o ganho logaritmico de X_2 com respeito a X_6 , apresenta-se uma alternativa para a obtenção da expressão dos ganhos e sensibilidades, nos ciclos r e s_2 .

Da equação do estado estacionário, no espaço logaritmico, para o ciclo referência

$$\log \alpha + g_{12}Y_2 + g_{16}Y_6 = \log \beta + h_{11}Y_1 + h_{15}Y_5 \quad (5.1)$$

tem-se

$$g_{12}L_{26} = -g_{16} + h_{11}L_{16} \quad (5.2)$$

A concentração do intermediário total, $X_7 = X_1 + X_2$, é conservada

$$\frac{\partial}{\partial Y_6}(X_1 + X_2) = \frac{\partial}{\partial Y_6}(\exp(Y_1) + \exp(Y_2)) = 0 \quad (5.3)$$

onde utilizou-se o facto de $X_i = \exp Y_i$.

A equação (5.3) permite obter a seguinte relação entre os ganhos L_{16} e L_{26}

$$L_{16} = -\frac{q_2}{q_1}L_{26} \quad (5.4)$$

Inserindo (5.4) em (5.2), tem-se

$$L_{26} = \frac{-g_{16}q_1}{h_{11}(1 - q_1) + g_{12}q_1} \quad (5.5)$$

Para o ciclo com sequestração de X_2 , a evolução de X_2 é dada pela mesma equação que no ciclo referência. A única diferença está na conservação da concentração total de intermediário, pois a quantidade conservada passa a ser

$$X_1 + X_2 + X_4 \quad (5.6)$$

Assumindo o equilíbrio entre X_2 e X_4 , isto é,

$$\frac{X_2}{X_4} = K_2 \quad (5.7)$$

a conservação com respeito à variação percentual de X_6 é

$$\frac{\partial}{\partial Y_6}(\exp(Y_1) + \frac{K_2 + 1}{K_2} \exp(Y_2)) = 0 \quad (5.8)$$

o que leva à equação

$$L_{26} = \frac{-g_{16}q_1}{h_{11}(1 - q_1) + g_{12}q_1} \quad (5.9)$$

para o caso com sequestração de X_2 . A expressão é a mesma para o caso referência mas

$$q_1 = \frac{X_1}{X_1 + X_2 + X_4} \quad (5.10)$$

Outros ganhos e sensibilidades podem ser calculados com raciocínios análogos.

5.2 Ordem cinética generalizada

Neste apêndice define-se a ordem cinética generalizada duma reacção em relação a um substrato X e mostra-se que para uma enzima de Michaelis-Menten, sem cooperatividade, a ordem cinética está compreendida entre 0 e 1.

A ordem cinética numa forma geral é

$$h(X) = \frac{d \log V}{d \log X} \quad (5.11)$$

ou seja, é a variação percentual da velocidade de reacção, V , com a variação percentual da concentração do substrato.

Para uma enzima Michaeliana,

$$V = \frac{V_{max}X}{K_M + X} \quad (5.12)$$

logo,

$$h(Z) = \frac{1}{1 + Z} \quad (5.13)$$

onde $Z = \frac{X}{K_M}$. A ordem cinética aproxima-se de 1 quando $Z \rightarrow 0$, isto é, quando a enzima está insaturada com o substrato. Com o aumento da concentração do substrato, torna-se cada vez mais difícil aumentar a velocidade da reacção, reflectindo o facto da enzima tornar-se saturada com o substrato. Ou seja, a ordem cinética aproxima-se de 0 quando $Z \rightarrow \infty$. Assim, a ordem cinética está entre 0 e 1.

Para a mesma enzima, no formalismo dos Sistemas S, a velocidade é aproximada por $V = \beta X^h$, sendo que a ordem cinética é constante

$$h(X) = h \quad (5.14)$$

que como já se mostrou, tem de estar entre 0 e 1, sendo que um valor próximo de 1 significa muita insaturação e um valor próximo de 0 significa saturação com o substrato.

Bibliografia

- [1] Reich, J.G., Sel’Kov, E.E., Energy Metabolism of the cell: A Theoretical Treatise, Academic Press, (1981).
- [2] Savageau, M.A. (1971): Parameter Sensitivity as a criterion for evaluating and comparing performance of Biochemical Systems: Nature, 229, page 542
- [3] Pedro M. B. M. Coelho, Armindo Salvador, Michael A. Savageau (2009): Quantifying Global Tolerance of Biochemical Systems: Design Implications for Moiety-Transfer Cycles, PLoS Computational Biology 5, e1000319
- [4] Savageau MA, Coelho PMBM, Fasani RA, Tolla DA, Salvador A (2009) "Phenotypes and tolerances in the design space of biochemical systems". Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A. 106:6435-40

- [5] Salvador *et al.*, artigo em preparação

- [6] Salvador A, Savageau MA (2003) "Quantitative evolutionary design of glucose 6-phosphate dehydrogenase expression in human erythrocytes". Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A. 100:14463-14468

- [7] Salvador A, Savageau MA (2006) "Evolution of enzymes in a series is driven by dissimilar functional demands". Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A. 103:2226-2231 Biol 5:e1000319

- [8] Savageau, M. A. (1969a). Biochemical systems analysis. I. Some mathematical properties of the rate law for the component enzymatic reactions. J Theor Biol 25:365-369.

- [9] Savageau, M. A. (1969b). Biochemical systems analysis. II. The steady-state solutions for an n-pool system using a power-law approximation. J Theor Biol 25:370-379.

- [10] Savageau, M. A. (1976). "Biochemical Systems Analysis: A Study of Function and Design in Molecular Biology," Addison-Wesley, Reading, Mass.

- [11] Savageau MA. (1970): Biochemical Systems Analysis .3. Dynamic solutions using a power-law approximation, J Theor Biol 26(2), pag 215

- [12] Alves R., Vilaprinyo E., Hernandez-Bermejo B., Sorribas A. (2008) :
Mathematical formalisms based on approximated kinetic representations
for modeling genetic and metabolic pathways, *Biotechnology Genetic
Engineering Reviews*, 25, pag 1

- [13] Fromm HJ (1975): *Initial Rate Enzyme Kinetics*. New York: Springer-
Verlag.

- [14] Savageau, M. A. (1972): The behavior of intact biochemical control
systems. *Curr Top Cell Regul*, 6: pag 63

- [15] Irvine D.H. (1991): The method of controlled mathematical compari-
sons, in Voit,E.O. (ed.), *Canonical Nonlinear Modeling: S-Systems Ap-
proach to Understanding Complexity*, Van Nostrand Reinhold, NY, pag.
90.